

10/522668

10 Rec'd PCT/PTO T/JP 03/09677
28 JAN 2005

30.07.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 19 SEP 2003

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 2 3 8 7 8
Application Number:

[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 2 3 8 7 8]

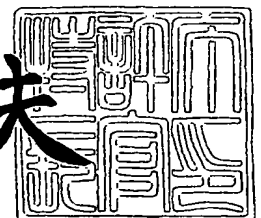
出 願 人 山之内製薬株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 9 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 7 2 1 7 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003171

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 武田 正敬

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 山地 昇

【特許出願人】

 【識別番号】 000006677

 【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089200

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長井 省三

【選任した代理人】

 【識別番号】 100109357

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005348

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素であるポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列の1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列のC末端側に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド。

【請求項4】 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項5】 請求項1乃至請求項4に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項5に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項7】 請求項6に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、消化管ホルモンの制御に関わる新規なセリンプロテアーゼの前駆体または成熟体であるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、及び該ベクターを含有する形質転換細胞に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

これまでに数百種類のプロテアーゼが報告され、全ゲノムの約1%がプロテアーゼをコードすると予測されている。これらのプロテアーゼの中には、単に蛋白やペプチドの消化を行う分子の他に、ペプチド鎖の切断を介して蛋白質の成熟や生理活性の発現、代謝の調節、情報の発現や伝達など生命現象に直結した重要な役割に参与している分子が多数あることが知られている。そのため、古くより、プロテアーゼ阻害剤の医薬品応用が進められてきており、実際、現在世界で販売されているトップ50の薬剤のうち、プロテアーゼ阻害剤は32%を占めている。

II型膜貫通セリンプロテアーゼはセリンプロテアーゼのうち、N末端側に膜貫通領域、細胞外のC末端側にプロテアーゼドメインを有する分子種であり(Hopper J. D. et al., J. Biol. Chem., 276, 857-860, 2001)、心房性ナトリウム利尿因子前駆体(proANP)から成熟体への変換を制御するコリン(Corin)(Yan, W. et al., PNAS, 97, 8525-8529, 2001)、トリプシノーゲンをトリプシンに変換するエンテロペプチダーゼ(Enteropeptidase)(Kitamoto, Y. et al., Biochemistry, 34, 4562-4568)など、重要な生理作用を調節する役割を担う分子が同ファミリーに分類される。また、これらのII型膜貫通セリンプロテアーゼの多くは比較的限局した特徴ある組織分布を示すことが報告されている(Hopper J. D. et al., J. Biol. Chem., 276, 857-860, 2001)。また、これらのセリンプロテアーゼは膜付近の細胞外マトリクスに作用し、細胞の分化、細胞同士の接着の緩和、上皮細胞での恒常性の維持、等に関与することが示唆されている(Carlo C. Quattrocchi. et al., J. Biol. Chem., 277, 303-309, 2001、Thien-Khai H. Vu. et al., J. Biol. Chem., 272, 31315-31320, 1997、Biochem. Biophys. Res. Commun., 287, 995-1002, 2001)。

小腸は栄養分の消化及び吸収を主とする消化管であるが、一方で、種々の生理活性ペプチドや、種々のホルモンの生産、分泌を担う内分泌器官でもあることが分かっている(大根田昭;メディコピア12 消化とホルモナー病態と検査-:94-108、1985)。1902年にBayliss, Starlingらが小腸より膵外分泌を血行性に刺激する物質として抽出したセクレチンの発見以来、消化管ホルモンは、候補も含め40以上のものが報告されてきているが、それらの大部分が脳でも発現している

ことから別名を神経ペプチド、または脳-腸ホルモンと呼ばれている。これら生理活性ペプチドは、その前駆体のプロセッシングにより生成することが知られている。これら生理活性ペプチドは自律神経と共に腸管の機能を制御し、過敏性腸症候群の発症にこれらのペプチドの異常が関与しているとされている（岸本真也；過敏性腸症候群の診断と治療：81-91、1989矢内原昇；過敏性腸症候群の診断と治療：214-218、1989、実験医学5：531-534、1987）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は小腸で産生されるホルモンのプロセッシングに関わるセリンプロテアーゼを提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、小腸で産生されるホルモンのプロセッシングに関わるヒトの新規なII型膜貫通セリンプロテアーゼ遺伝子全長配列、全長ORFを決定することに成功した。更に、全長遺伝子を取得、組換え体の発現を可能にし、該プロテアーゼの活性を検出する方法を確立した。ホルモンは生体のホメオスタシスの維持や機能の発現などを担う分子であり、ホルモンのプロセッシング、分泌や分解、その発現制御に関わる分子の分解を制御することにより、標的としたホルモンの作用を修飾することができ、その結果、該ホルモンの関わる疾患の治療に繋がることが期待できる。特に、上記プロテアーゼ成熟体の活性を阻害することにより過敏性腸症候群の治療が可能となる。

【0005】

すなわち本発明は、

〔1〕配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素であるポリペプチド、

〔2〕配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド、

〔3〕 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 5 0 番のアミノ酸配列、あるいは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 5 0 番のアミノ酸配列の 1 ～ 1 0 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列の C 末端側に、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 5 1 番～第 5 3 1 番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド、

〔4〕 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

〔5〕 〔1〕乃至〔4〕に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

〔6〕 〔5〕に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

〔7〕 〔6〕に記載の発現ベクターで形質転換された細胞

に関する。

【0 0 0 6】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「前駆体」は「酵素前駆体」を示しており、これ自体では不活性型であるが、活性化（プロセッシング）を受けて活性型酵素となる蛋白質を表す。「成熟体」は、活性化を受けて活性型となった酵素である蛋白質を表す。「プロテアーゼ活性」は、ペプチド結合の加水分解を触媒する活性であり、主として活性型酵素（成熟体）の示す酵素活性を表す。

【0 0 0 7】

本発明のポリペプチドには、

（1）配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 2 3 7 番～第 5 3 1 番のアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下、「ポリペプチド 2 3 7 / 5 3 1」と称することがある）；

（2）配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（3）配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 5 1 番～第 5 3 1 番のアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下、「ポリペプチド 5 1 / 5 3 1」と称することがある）（以下、（2）及び（3）をあわせて「本発明の前駆体」と称することがある）；

(4) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、「ポリペプチド237/531の機能的等価改変体」と称することがある）；

(5) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、「ポリペプチド51/531の機能的等価改変体」と称することがある）

(6) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列の1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列のC末端側に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド。（以下、(5)及び(6)を「本発明の前駆体の機能的等価改変体」と称する）；及び

(7) ポリペプチド237/531を含み、かつ、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、ポリペプチド51/531のアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド（以下、「本発明の相同ポリペプチド」と称する）が含まれる。

「ポリペプチド237/531の機能的等価改変体」および「本発明の前駆体の機能的等価改変体」を総称して「本発明の機能的等価改変体」と称するが、「本発明の機能的等価改変体」としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」、あるいは「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列の

C末端側に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド」が含まれるが、各本発明の機能的等価改変体のうち、小腸に高発現されるポリペプチドが好ましい。また、本発明の機能的等価改変体には、本発明のポリペプチド、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、ポリペプチド51/531、又はポリペプチド237/465のN末端及び/又はC末端に、適当なマーカー配列等を付加したポリペプチド（すなわち、融合ポリペプチド）も、プロテアーゼ活性を示すか、あるいは、プロセッシングを受けた後にプロテアーゼ活性を示す限り含まれる。

前記マーカー配列としては、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

本発明の機能的等価改変体の起源はヒトに限定されない。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト由来の変異体、又はヒト以外の生物由来の機能的等価改変体）又は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを元にして遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」（variation）とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

【0008】

「本発明の相同ポリペプチド」は、「ポリペプチド237/531を含み、かつ、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、ポリペプチド51/531のアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド」である限り、特に限定されるものではないが、該相同性が、好ましくは98%以上であるアミノ酸配列を含むことができ、また、各相同ポリペプチドのうち、小腸に高発現されるポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLASTパッケージ[sgi32bit版,バージョン2.0.12;National Center for Biotechnology Information(NCBI)より入手]のbl2seqプログラム(Tatiana A.Tatusova, Thomas L.Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999)を用いて得られた値を意味する。なお、パラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメーターとして、

「プログラム名」として「blastp」を、「Gap挿入Cost値」を「0」で、「Gap伸長Cost値」を「0」で、「Matrix」として「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

【0009】

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、本発明のポリペプチドのうち、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「ARS蛋白質」と称する。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドはARS蛋白質全長ORFであり、ポリペプチド51/531は細胞外領域であり、いずれも酵素の前駆体に関するものである。また、ポリペプチド237/531はセリンプロテアーゼ領域およびC末端配列であると推定される。後述の実施例に示すように配列番号2に記載の酵素前駆体は、酵素分解的にN末端領域をプロセシングし、成熟体（活性型酵素）となった結果、酵素活性が増強することが明らかとなっている。また同様に、細胞外領域（ポリペプチド51/531）も活性型酵素を得る為に用いることができる。セリンプロテアーゼ領域およびC末端配列であると推定されるポリペプチド237/531は、酵素活性が観察されたことから、該領域を有すれば酵素活性を示すことが確認された。

【0010】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする限り、特に

限定されるものではなく、例えば、配列番号1で表される塩基配列、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基配列、あるいは、配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1593番の塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。配列番号1で表される塩基配列からなる前記ポリヌクレオチドは配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする。また、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基からなる前記ポリヌクレオチドは、ポリペプチド51／531を、配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1593番の塩基からなる前記ポリヌクレオチドは、ポリペプチド237／531をコードする。

本発明のポリヌクレオチドは、当業者であれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、ポリペプチド51／531、またはポリペプチド237／531をコードする塩基配列（例えば、配列番号1で表される塩基配列、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基からなる配列または配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1593番の塩基からなる配列）の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法（例えば、Sambrook, Jら, “Molecular Cloning—A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989等の遺伝子操作実験マニュアル）に従って実施することが可能である。

【0011】

例えば、配列番号1で表される塩基配列、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基からなる配列、または配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1596番の塩基からなる配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物〔例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）〕由来の試料（例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー）とを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（Saiki, R.K. ら, Science, 239, 487-491, 1988）又はハイブリダイゼーション法

を実施することにより、ポリヌクレオチドを取得できる。そのポリヌクレオチドを適当な発現系（例えば、実施例7に記載の方法）を用いて発現させることにより本発明のポリペプチドが得られる。例えば、実施例8に記載の方法により、該ポリペプチドまたは該ポリペプチドがプロセッシングを受けて生成した成熟体がプロテアーゼ活性を示すことを確認できる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドは、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法（site-specific mutagenesis; Mark, D.F.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984）により、ポリヌクレオチドを取得し、該ポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドまたは該ポリペプチドがプロセッシングを受けて生成した成熟体が、例えば、実施例8に記載の方法により、プロテアーゼ活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドには、本発明の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させることにより得られる、活性化に伴う切断を受けたポリペプチドもプロテアーゼ活性を示す限り含まれる。好ましくは、配列番号2で表されるアミノ酸配列におけるセリンプロテアーゼの活性化配列の間、即ち、第236番目と第237番目のアミノ酸の間が切断されて生成した、セリンプロテアーゼ活性を有する、N末端が第237番目のアミノ酸であるポリペプチド（すなわち、ポリペプチド237/531であると推定される）である。

また、本発明のポリペプチドには、本発明の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させることにより得られた蛋白質を好ましくは実施例9に記載の方法によりトリプシン処理して得られる、活性化に伴う切断を受けたポリペプチドもプロテアーゼ活性を示す限り含まれる。

本明細書において、あるポリペプチドが「プロテアーゼ活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、蛍光標識された合成ペプチド、例えばMCA (4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)でC末端を標識された合成ペプチドを用いて酵素切断活性を検出することにより確認することができ(Yasuoka, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 16, 300-308, 1997)、より好ましくは、実施例7に記載の方法により確認することができる。

【0012】

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、（１）PCRを用いた方法、（２）常法の遺伝子工学的手法（すなわち、cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望のcDNAを含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は（３）化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、W001/34785に記載されていると同様に実施できる。ただし、上記特許出願明細書における「本発明の新規蛋白」を本発明のポリペプチド、「本発明の遺伝子」を本発明のポリヌクレオチドと読み替える。

以下、各製造方法について、順次、説明する。

PCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織からmRNAを抽出する。次いで、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、本発明のポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる２個１組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる２個１組のプライマーセットを作成する。変性温度又は変性剤添加条件などを適宜選択し、作成した各々のプライマーセットに適した逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応（RT－PCR）を行なうことにより、本発明のポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

あるいは、本発明のポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織から調製したmRNAから逆転写酵素により作製したcDNA、あるいは、市販のヒト細胞又は組織由来のcDNAを鋳型として、PCRを行なうことにより、本発明のポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

より詳細には、まず、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織から、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを含む総RNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート－グアニジン・塩酸法、又はグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法等を挙げることができるが、グアニジン・チオシアネート塩化セシウム法を用いることが好ましい。本発明のポリペプチドの

産生能力を有する細胞又は組織は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いたノーザンブロッティング法、あるいは、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

続いて、抽出したmRNAを精製する。mRNAの精製は常法に従えばよく、例えば、mRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着後、溶出させることにより精製することができる。所望により、シヨ糖密度勾配遠心法等によりmRNAを更に分画することもできる。また、mRNAを抽出しなくても、市販されている抽出精製済みのmRNAを用いることもできる。

次に、精製されたmRNAを、例えば、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー、及び／又はカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行ない、第1鎖cDNAを合成する。この合成は、常法によって行なうことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的ポリヌクレオチドの全長又は一部の領域を挟んだ2種類のプライマーを用いてPCRを実施し、目的とするcDNAを増幅することができる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、前記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

【0013】

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法b)第2製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法c)第3製造法、d)第4製造法に記載された方法によって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。より具体的には、化学合成法によって製造したヌクレオチド断片を結合することによっても製造できる。また、各ポリヌクレオチド(オリゴヌクレオチド)は、DNA合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer(ベックマン社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer(アプライドバイオシステムズ社)など)を用いて合成することができる。

本発明の発現ベクター、宿主細胞、蛋白質の製造方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造方法に記載された方法により実施できる。単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、真核生物又は原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

また、本発明の細胞も、本発明の前記発現ベクターでトランスフェクションされ、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明のポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞であることもできるし、あるいは、本発明のポリペプチドを発現していない細胞であることもできる。本発明の細胞は、例えば、本発明の発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。より具体的には、例えば、実施例3、実施例4、実施例5、及び実施例6に記載のように本発明のポリヌクレオチドをほ乳類動物細胞用の発現ベクターpCEP4dE2-FLAG(WO 01/34785実施例3)に組み込むことにより、所望の蛋白質の発現ベクターを得ることができ、該発現ベクターを市販のトランスフェクション試薬FuGENETM6を用いてヒト胎児腎臓由来HEK293-EBNA細胞に取り込ませて本発明の形質転換細胞を製造することができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により本発明の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記293T細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小

必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞に生産される本発明の蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。

本発明の蛋白質はマーカー配列とインフレーションで融合して発現させることで、該蛋白質の発現の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG エピトープ、ヘキサ・ヒスチジンタグ、ヘマグルチニンタグ、myc エピトープなどがある。また、マーカー配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクター Xa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

【0014】

＜本発明のプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法＞

本発明のスクリーニング法は、特に限定されるものではないが、蛍光標識された合成ペプチド、例えば MCA (4-Methyl-Coumaryl-7-Amide) で C 末端を標識された合成ペプチドを用いて酵素切断活性を検出することにより確認することができ (Yasuoka, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 16, 300-308, 1997)、より好ましくは、実施例 7 に記載に記載の方法により実施することが出来る。

例えば実施例 7 に記載の条件で、 $IC_{50}=10\mu M$ 以下の物質を、好ましくは $IC_{50}=1\mu M$ 以下の物質を、更に好ましくは $IC_{50}=0.1\mu M$ 以下の物質をプロテアーゼ阻害活性を有する物質として、選択することができる。また、このようにプロテアーゼ阻害活性を有する物質を選択することによって消化器疾患治療剤、特に過敏性腸症候群の治療剤を得ることができる。

本発明のスクリーニング法で使用する被検物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物 (ペプチドを含む)、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物 (ペプチドを含む)、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (N.K.Terrett, M.Gardner, D.W.Gordon, R.J.Kobylecki, J.Steele, Tetrahedron, 51, 8135-73 (1995)) によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリ

ーニング法により選択された化合物（ペプチドを含む）を化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を挙げることができる。

【 0 0 1 5 】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989等)の遺伝子操作実験マニュアルに従った。

【 0 0 1 6 】

（実施例1）ARSの全長ORF配列の決定

ヒト小腸由来のcDNA(Marathon-Ready™ cDNA；クロンテック社)を鋳型とし、cDNA A末端増幅PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends、RACE) を繰り返すことにより、5' 側および3' 側の塩基配列を解読し、新規遺伝子配列の全長のオープンリーディングフレーム(open reading frame、ORF)配列を決定した。以下に、詳細を記した。5' RACEにはプライマーとしてGSPR1～10を用いた。GSPR1（配列番号5）とAP-1（Marathon-Ready™ cDNA添付品；クロンテック社）（配列番号3）を1st PCRプライマー、ヒト小腸由来のcDNA(Marathon-Ready™ cDNA；クロンテック社)を鋳型とし、DNAポリメラーゼ(TaKaRa LA Taq™；宝酒造社)を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に97℃(2分間)で熱変性を行なった後、97℃20秒、60℃30秒、72℃2分のサイクルを40回、72℃7分の条件でPCRをおこなった。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動をおこなった。DNAの増幅を確認した、先のPCR反応液を滅菌水で50倍に希釈したものを、2nd PCRのテンプレートとし、GSPR-2（配列番号6）とAP-2（Marathon-Ready™ cDNA添付品；クロンテック社）（配列番号4）をプライマー、DNAポリメラーゼ(Pyrobest(商標) DNA polymerase;宝酒造社)を用い、96℃2分半の後、97℃20秒、68℃30秒、72℃60秒のサイクルを40回、続いて72℃7分の条件でPCRをおこなった。こうして増幅された遺伝子を直接、ジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー（ABI3700 DNA Sequencer；アプライドバイオシステムズ社）を用いて配列解析した。[GSPR3（配列番号7

）とGSPR4（配列番号8）]、[GSPR5（配列番号9）とGSPR6（配列番号10）]、[GSPR7（配列番号11）とGSPR8（配列番号12）]、及び[GSPR9（配列番号13）とGSPR10（配列番号14）]のそれぞれ2本ずつの組み合わせについても同様にAP-1とセットで1stPCR、AP-2とセットで2ndPCRをおこない、5'側の配列を決定していった。また、3'側の遺伝子配列についても5'側同様に1st3'RACEのプライマーとしてGSPF1（配列番号15）とAP-1、を用い、前記cDNAをテンプレートとし、DNAポリメラーゼ(TaKaRa LA Taq™; 宝酒造社)を用い97℃(2分間)で熱変性を行なった後、97℃20秒、60℃30秒、72℃2分のサイクルを40回、72℃7分の条件でPCRをおこなった。反応液のアガロースゲル電気泳動をおこない、DNAの増幅を確認した後、先のPCR反応液を滅菌水で50倍に希釈したものを、2nd PCRのテンプレートとし、GSPR-2（配列番号16）とAP-2をプライマー、DNAポリメラーゼ(Pyrobest (商標) DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、96℃2分半の後、97℃20秒、68℃30秒、72℃60秒のサイクルを40回、続いて72℃7分の条件でPCRをおこなった。こうして増幅された遺伝子を直接、ジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー(ABI3700 DNA Sequencer; アプライドバイオシステムズ社)を用いて配列解析することで3'側のORFを決定し、全ORFを決定した。そしてこの遺伝子をARSと名付けた。該遺伝子の全長塩基配列を配列番号1に、推定アミノ酸配列を配列番号2に示した。ARSのORFは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番から第531番までの531アミノ酸からなる新規蛋白質をコードしており、ホモロジー検索の結果、そのドメイン構造はN末から、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、プロ領域、プロテアーゼ活性化配列、セリンプロテアーゼドメイン、C末端配列であり、II型膜貫通セリンプロテアーゼファミリーに属する分子であった。

【0017】

(実施例2) ARS遺伝子の組織発現分布

市販のcDNAパネル(Human MTC Panel I、Human MTC Panel II、Human Fetal MTC Panel、及びHuman Tumor MTC Panel; クロンテック社)を用いて、ARS遺伝子の組織発現分布を以下の手順で解析した。

すなわち、配列番号17と配列番号19とで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとし、前記cDNAパネルを鋳型として、DNAポリメラーゼ(Ta

KaRa LA Taq™; 宝酒造社)を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に96℃(2分間)で熱変性を行なった後、97℃20秒、60℃30秒、72℃2分のサイクルを40回、72℃7分の条件でPCRをおこなった。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動を行ない、ARS遺伝子のmRNAに由来する約1.5kbpのDNA断片を検出した。その結果、ARS遺伝子のmRNAは、小腸において強発現しており、肺、大腸、及び脾臓ではほとんど発現していないことが判明した。

【0018】

(実施例3) 新規II型膜貫通セリンプロテアーゼ遺伝子ARS全長ORF遺伝子のクローニング

配列番号18と配列番号19で示されるオリゴDNAとをプライマーとし、ヒト小腸由来のcDNA (Marathon-Ready™ cDNA; クロンテック社) を鋳型として、DNAポリメラーゼ (Pyrobest (商標) DNA polymerase; 宝酒造社) を用いて、96℃2分半の後、97℃20秒、60℃30秒、72℃2分のサイクルを45回、続いて72℃7分の条件でPCRを行った。こうして生成した約1.5 kbpの断片をクローニングベクター (pCR4Blunt-TOPO; インビトロジェン社) にアンピシリン耐性を指標にサブクローニングし、プラスミドクローンを制限酵素EcoRI処理した場合に、クローニングベクターのクローニング部位両側に存在するEcoRI認識配列により切断され、約1.5 kbのインサート配列が生成するプラスミドクローンpPCR617-5' Fを選択した。ここで得られたプラスミドクローンpPCR617-5' Fを鋳型にし、5'側にXbaI認識配列およびコザック (Kozak) 配列が付加された配列番号20と配列番号19で示されるオリゴDNAとをプライマーとし、DNAポリメラーゼ (Pyrobest (商標) DNA polymerase; 宝酒造社) を用いて、95℃2分半の後、97℃20秒、60℃30秒、72℃2分のサイクルを40回、続いて72℃7分の条件でPCRを行った。こうして生成した約1.5 kbの断片をクローニングベクター (PCR4Blunt-TOPO; インビトロジェン社) に、アンピシリン耐性を指標にサブクローニングし、プラスミドクローンを制限酵素EcoRI処理した場合にクローニングベクターのクローニング部位の両側に存在するEcoRI認識配列が切断され、約1.5 kbのインサート配列が生成するプラスミドクローンpCR617-XbaF1を選択した。また、配列番号21と3'側にNotI認識配列が付加された配列番号22で示されるオリゴDNAとをプライマー、ヒト小腸由来のcDNA

(Marathon-ReadyTM cDNA；クロンテック社)を鋳型、DNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase；宝酒造社)を用いて、96℃2分半の後、97℃20秒、60℃30秒、72℃30秒のサイクルを40回、続いて72℃7分の条件でPCRを行った。(1) こうして生成した約0.6 kbpの断片をフェノール/クロロホルム処理後、増幅配列中に存在するApaI認識配列とプライマー部位に挿入したNotI認識配列を利用し、制限酵素ApaI、NotIで切断して得られた約0.6 kbpのDNA断片と、(2) 先に取得したpCR617-XbaF1のインサート内に存在するApaI認識配列とサブクローニングの際にプライマー部位に挿入したXbaI認識配列とを利用し、制限酵素XbaI、ApaIで切断して得られた約1kbpのDNA断片とを連結させ、pCEP4dE2-FLAG(WO 01/34785実施例3)のXbaI、NotI部位に挿入して、全長蛋白質発現プラスミドpCEP-ARSF-FLAGを完成した。pCEP4dE2-FLAGに挿入された配列をジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー(ABI3700 DNA Sequencer；アプライドバイオシステムズ社)を用いて配列解析したところ、配列番号1の1番から1593番で表される塩基配列であることが確認された。

この発現プラスミドpCEP-ARSF-FLAGは配列番号2の1番から531番にコードされるポリペプチドのC末端にFLAG配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

【0019】

(実施例4) ARS細胞外領域蛋白質発現プラスミドの構築

配列番号2の51番から531番にコードされるポリペプチドをN末端に分泌シグナル配列、FLAGを付加した蛋白質として発現するためのプラスミドを以下のように構築した。

まず、配列番号1の151番から1596番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、BglIII認識配列が付加された配列番号23とXhoI認識配列が付加された配列番号24で示されるオリゴDNAをプライマー、鋳型としてpCEP-ARS-FLAG、DNAポリメラーゼ(Pyrobest (商標) DNA polymerase；宝酒造社)を用いて、96℃2分の後、98℃15秒、65℃30秒、72℃1分30秒のサイクルを36回、続いて72℃7分の反応を行った。こうして生成したDNA断片をpCR4Blunt-TOPOベクター(インビトロジェン社製)にサブクローニングし、ジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー

(ABI3700 DNA Sequencer ; アプライドバイオシステムズ社) を用いて配列を確認した。BglIII、XhoI部位で目的のDNA断片を切り出し、pCEP-signal-FLAGベクターのBamHI、XhoI部位に挿入しpCEP-signal-FLAG-ARS-extracellularを完成させた。

この発現プラスミドpCEP-signal-FLAG-ARS-extracellularは配列番号2の51番から531番にコードされるポリペプチドのN末端に分泌シグナル配列、FLAG配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

【0020】

(実施例5) ARSのセリンプロテアーゼドメインおよびC末端配列発現プラスミドの構築

配列番号2の237番から531番にコードされるポリペプチドをN末端に分泌シグナル配列、FLAGを付加した蛋白質として発現するためのプラスミドは以下のように構築した。

まず、配列番号1の709番から1596番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、BglIII認識配列が付加された配列番号25と配列番号24で示されるオリゴDNAプライマー、鋳型としてpCEP-ARS-FLAG、DNAポリメラーゼ (Pyrobest (商標) DNA polymerase ; 宝酒造社) を用いて、96℃2分の後、98℃15秒、65℃30秒、72℃1分のサイクルを35回、続いて72℃7分の反応を行った。こうして生成したDNA断片を制限酵素BglIIIおよびXhoIで切断した後、pCEP4-signal-FLAGベクターのBamHI、XhoI部位に挿入しpCEP-signal-FLAG-ARS-SerPDを完成させた。ジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー (ABI3700 DNA Sequencer ; アプライドバイオシステムズ社) を用いて配列解析したところ、配列番号1で表される塩基配列の709番から1596番の塩基からなる配列であることが確認された。

この発現プラスミドpCEP-signal-FLAG-ARS-SerPDは配列番号2の237番から531番にコードされるポリペプチドのN末端に分泌シグナル配列、FLAG配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

【0021】

(実施例6) ARSのセリンプロテアーゼドメイン発現プラスミドの構築

配列番号2の237番から464番にコードされるポリペプチドをN末端に分泌シグナル

配列、FLAGを付加した蛋白質として発現するためのプラスミドは以下のように構築した。

まず、配列番号1の709番から1392番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、BglIII認識配列が付加された配列番号25と、XhoI認識配列及び終止コドン配列が付加された配列番号26で示されるオリゴDNAをプライマーとし、鋳型及びPCR条件は実施例5と同様にしてPCRを行った。生成したDNA断片を制限酵素BglIIIおよびXhoIで切断した後、pCEP4-signal-FLAGベクターのBamHI、XhoI部位に挿入しpCEP-signal-FLAG-ARS-SerPD0を完成させた。ジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー（ABI3700 DNA Sequencer；アプライドバイオシステムズ社）を用いて配列解析したところ、配列番号1で表される塩基配列の709番から1392番の塩基からなる配列であることが確認された。

この発現プラスミドpCEP-signal-FLAG-ARS-SerPD0は配列番号2の237番から464番にコードされるポリペプチドのN末端に分泌シグナル配列、FLAG配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

【0022】

（実施例7）ARS-FLAG、signal-FLAG-ARS-extracellular、signal-FLAG-ARS-SerPD、signal-FLAG-ARS-SerPD0の動物細胞株での発現

実施例3～5において作製した発現プラスミドをトランスフェクション試薬（FuGENETM6 Transfection Reagent；ロシュ社）を用いて添付指示書に従いHEK293-EBNA細胞（インビトロジェン社）に導入した。プラスミド導入後12-16時間で培地を無血清に置換した後、さらに48-60時間培養を継続し、培養上清を回収し、得られた各培養液を、遠心分離器（8800型；久保田製作所社）により遠心分離（3000rpm、10分間）することにより、培養上清を得た。また、前記培養上清を除去した後に残った細胞を、リン酸緩衝液（PBS：10mMリン酸ナトリウム、pH 7.5）にて洗浄後、リン酸緩衝液にてピペッティングにより細胞を培養プレートより剥離したものを遠心分離器（8800型遠心分離器；久保田製作所社）にて3000rpm、10分の遠心分離した沈殿をリン酸緩衝液に懸濁させたものを細胞画分とした。pCEP-ARSF-FLAG、pCEP-signal-FLAG-ARS-extracellular、pCEP-signal-FLAG-ARS-SerPDを導入して得られてた遠心分離処理後の培養上清を以下、各々ARSF-FLAG培養上清、s

signal-FLAG-ARS-extracellular培養上清、signal-FLAG-ARS-SerPD培養上清、signal-FLAG-ARS-SerPD0培養上清と称する。

培養上清中並びに細胞内に目的蛋白が存在することを末端に付加したFLAGタグに対する抗体（マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2；シグマ社）を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清（15 c mシャーレ1枚より回収した培養上清12m l 中20 μ l）並びに細胞画分（15 c mシャーレ1枚より回収した細胞を10m l のリン酸緩衝液に懸濁させた細胞画分5 μ l）をSDS/4%~20% アクリルアミドゲル（第一化学薬品社）で電気泳動（還元条件）後、ブロッティング装置を用いてPVDF膜（ミリポア社）に転写した。転写後のPVDF膜にブロックエース（大日本製薬社）を添加してブロッキングした後、ビオチン化マウス抗FLAGモノクローナル抗体（M2；シグマ社）、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（アマシャムファルマシア社）を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社）を用いて目的蛋白の発現を確認した。ARS-FLAGを発現させた場合、細胞画分に予想分子量約55-60kDの全長タンパクと考えられるバンドが検出されたほか、約35-40kDの蛋白が検出された。また培養上清中にも空ベクターを導入した場合には検出されない分子量約55-60kDと35-40kDのバンドが検出された。培養上清中と比べ、細胞画分中に少なくとも約10倍以上の発現蛋白が検出され、大部分の発現蛋白は細胞内に留まっていることが確認されると共に、ARS遺伝子産物はセリンプロテアーゼファミリーに保存されたプロ領域とセリンプロテアーゼドメインの間にある活性化配列で切断されて成熟体となるものがあり、切断された場合でも大部分はシステイン間のS-S結合等により細胞外に放出されないでいることが示唆された。一方、signal-FLAG-ARS-extracellularを発現させた細胞では細胞画分に約50-60kD、約23-25kD、約20-23kDのバンドが検出され、同様のバンドは培養上清中でも確認された。またsignal-FLAG-617-SerPDを発現させた細胞では細胞画分に分子量約30-35kD、約27kD、約24kDのバンドが検出され、培養上清中には主として35-37kDのバンドが検出された。signal-FLAG-ARS-SerPD0を発現させた細胞では細胞画分に分子量約25-28kD、約24kD、約23kDのバンドが検出され、培養上清中には主として約25-28kDのバンドが検出され、それぞれの蛋白の発現が確認

された。

セリンプロテアーゼが活性化するとき切断されることが知られている活性化部位(小出武比古、医学の歩み、198,11-16、2001)がARSにも存在する(配列2で示した236番アルギニンと237番イソロイシン)ことからこの間で切断され、さらにそのN端側で少なくとも1箇所切断されと考えられる。また、既知のII型セリンプロテアーゼHAT(Yamaoka, K. et al., J. Biol. Chem. 273, 11895-11901, 1998), Desc1 (Lang, J.C. and Schuller, D.E., British J. Cancer, 84, 237-243, 2001), hepsin (Leytus, S. P. et al., Biochemistry, 27, 1067-1074, 1988), Spinesin (TMPRSS5) (Nozomi Yら, J. Biol. Chem. 277, 6806-6812, 2002) とのアミノ酸配列の比較から、ジスルフィド結合を形成すると推定されているシステイン残基がARSでも保存されている(Cys225、346、262、278、392、406、417、446)ことから約26kDのセリンプロテアーゼドメインを含むポリペプチドとN端側のポリペプチドがジスルフィド結合を形成していると推測される。(他のプロテアーゼとの比較からCys225と346の間でジスルフィド結合が形成されていると予想される。)

【0 0 2 3】

(実施例8) 合成ペプチドを用いた組換え体ARS蛋白質の酵素活性の検出

MCA (4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)でC末端を標識された合成ペプチドを用いて酵素的切断活性を検出する方法は特に断りの無い限り、論文報告された方法(Yasukawa, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 16, 300-308, 1997)に従った。すなわち、MCAでC末端を標識された合成ペプチド(ペプチド研究所)を基質として、96穴プレートに終濃度100 μ MとなるようにTBS (20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl) 中に基質を希釈した。この基質溶液に実施例6に示したARS-FLAG、signal-FLAG-ARS-extracellular、signal-FLAG-ARS-SerPD、signal-FLAG-ARS-SerPD培養上清及びコントロールとして空ベクターを遺伝子導入した場合の培養上清を添加した後、37℃でインキュベートした。その後合成ペプチドから酵素により切断されて遊離したAMC (7-Amino-4-Methyl-Coumarin)の蛍光を蛍光測定プレートリーダー(Fluostar、SLT社)で励起波長390 nm、測定波長460 nmにて測定した。この結果、ARS-FLAG、signal-FLAG-ARS-extracellular、signal-FLAG-A

RS-SerPD、signal-FLAG-ARS-SerPD0培養上清はいずれも空ベクターを遺伝子導入した場合の培養上清では得られない合成ペプチドBoc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA、Boc-Gln-Arg-Arg-MCA、及びBoc-Phe-Ser-Arg-MCAの切断活性を示した。

【0 0 2 4】

(実施例9) トリプシンビーズによるARSの活性化

Signal-FLAG-ARS-extracellular培養上清をトリプシンビーズ (Immobilized trypsin-Sepharose 4B; Worthington社) で処理した場合に人工基質の分解活性の上昇がみられるかを調べた。トリプシンビーズを用いた酵素の処理方法については特に断りの無い限り、論文報告された方法(Shigeki Satomiら., Biochem. Biophys. Res. Com., 287, 995-1002, 2001)に従った。以下に詳細を示した。

酵素試料及びコントロール試料としては実施例7と同様にして得たsignal-FLAG-ARS-extracellular培養上清、空ベクターを遺伝子導入した場合の培養上清を用いた。0.1M炭酸アンモニウムバッファーで3回洗浄し、同バッファー中に懸濁したトリプシンビーズと、前述の各々の試料とを1:2~1:4の比率で混合し、前記バッファー中、37℃で2時間処理をおこなった。処理後、遠心分離器 (M150-IV型; 佐久間製作所) で4℃、毎分3000 回転で3分間遠心して上清を回収し、更に回収した上清を遠心分離器 (M150-IV型; 佐久間製作所) で4℃、毎分6000 回転で3分間遠心して上清を回収することでトリプシンビーズを除去した。このようにして得られたトリプシンビーズ処理した酵素試料及びコントロール試料の人工基質Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCAの分解活性を実施例7で示した酵素活性検出法を用いて比較した。その結果、signal-FLAG-ARS-extracellular培養上清をトリプシンビーズ処理した試料は、トリプシンビーズ未処理の場合と比べて10倍以上の活性の上昇が確認された。一方、コントロール試料、及び、トリプシン処理後のコントロール試料では人工基質の分解活性は観察されなかった。このことにより、ARSは他のプロテアーゼによる活性化の制御を受けている可能性が考えられた。Signal-FLAG-ARS-extracellularをトリプシン処理して得られる試料は、高活性であり、本発明のプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングするのに用いることが出来る。

【0 0 2 5】

【発明の効果】

本発明は小腸に高発現するプロテアーゼを提供するものであり、その活性を制御する物質には消化管ホルモンの係わる疾患の治療に応用できることが期待される。中でも、それらの物質は、過敏性腸症候群との関連が示されているホルモンなどのプロセッシングや分解を小腸局所で制御でき、過敏性腸症候群治療薬になる可能性が高い。すなわち、本発明は消化管ホルモンの制御という作用機序を有する医薬品のスクリーニングを可能にする点で産業上の有用性が高い。

【 0 0 2 6 】**【配列表フリーテキスト】**

以下の配列表の数字見出し< 2 2 3 >には、「A r t i f i c i a l S e q u e n c e」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号6、8～11の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

【 0 0 2 7 】**【配列表】**

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd.

<120> Novel serine protease

<130> 3171ARS

<140>

<141>

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1596

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1593)

<400> 1

atg gag ccc act gtg gct gac gta cac ctc gtg ccc agg aca acc aag 48

Met Glu Pro Thr Val Ala Asp Val His Leu Val Pro Arg Thr Thr Lys

1 5 10 15

gaa gtc ccc gct ctg gat gcc gcg tgc tgt cga gcg gcc agc att ggc 96

Glu Val Pro Ala Leu Asp Ala Ala Cys Cys Arg Ala Ala Ser Ile Gly

20 25 30

gtg gtg gcc acc agc ctt gtc gtc ctc acc ctg gga gtc ctt ttg gcc 144

Val Val Ala Thr Ser Leu Val Val Leu Thr Leu Gly Val Leu Leu Ala

35 40 45

ttc ctc tct aca cag ggc ttc cac gtg gac cac acg gcc gag ctg cgg 192

Phe Leu Ser Thr Gln Gly Phe His Val Asp His Thr Ala Glu Leu Arg

50 55 60

gga atc cgg tgg acc agc agt ttg cgg cgg gag acc tcg gac tat cac 240

Gly Ile Arg Trp Thr Ser Ser Leu Arg Arg Glu Thr Ser Asp Tyr His
65 70 75 80

cgc acg ctg acg ccc acc ctg gag gca ctg ttt gta agt agt ttt cag 288
Arg Thr Leu Thr Pro Thr Leu Glu Ala Leu Phe Val Ser Ser Phe Gln
85 90 95

aag aca gag tta gag gca agc tgc gtg ggt tgc tcg gta ctg aat tat 336
Lys Thr Glu Leu Glu Ala Ser Cys Val Gly Cys Ser Val Leu Asn Tyr
100 105 110

agg gat ggg aac tcc agt gtc ctc gta cat ttc cag ctg cac ttt ctg 384
Arg Asp Gly Asn Ser Ser Val Leu Val His Phe Gln Leu His Phe Leu
115 120 125

ctg cga ccc ctc cag acg ctg agc ctg ggc ctg gag gag gag cta ttg 432
Leu Arg Pro Leu Gln Thr Leu Ser Leu Gly Leu Glu Glu Glu Leu Leu
130 135 140

cag cga ggg atc cgg gca agg ctg cgg gag cac ggc atc tcc ctg gct 480
Gln Arg Gly Ile Arg Ala Arg Leu Arg Glu His Gly Ile Ser Leu Ala
145 150 155 160

gcc tat ggc aca att gtg tcg gct gag ctc aca ggg aga cat aag gga 528
Ala Tyr Gly Thr Ile Val Ser Ala Glu Leu Thr Gly Arg His Lys Gly
165 170 175

ccc ttg gca gaa aga gac ttc aaa tca ggc cgc tgt cca ggg aac tcc 576
Pro Leu Ala Glu Arg Asp Phe Lys Ser Gly Arg Cys Pro Gly Asn Ser

180

185

190

ttt tcc tgc ggg aac agc cag tgt gtg acc aag gtg aac ccg gag tgt 624

Phe Ser Cys Gly Asn Ser Gln Cys Val Thr Lys Val Asn Pro Glu Cys

195

200

205

gac gac cag gag gac tgc tcc gat ggg tcc gac gag gcg cac tgc gag 672

Asp Asp Gln Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Ala His Cys Glu

210

215

220

tgt ggc ttg cag cct gcc tgg agg atg gcc ggc agg atc gtg ggc ggc 720

Cys Gly Leu Gln Pro Ala Trp Arg Met Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly

225

230

235

240

atg gaa gca tcc ccg ggg gag ttt ccg tgg caa gcc agc ctt cga gag 768

Met Glu Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Glu

245

250

255

aac aag gag cac ttc tgt ggg gcc gcc atc atc aac gcc agg tgg ctg 816

Asn Lys Glu His Phe Cys Gly Ala Ala Ile Ile Asn Ala Arg Trp Leu

260

265

270

gtg tct gct gct cac tgc ttc aat gag ttc caa gac ccg acg aag tgg 864

Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asn Glu Phe Gln Asp Pro Thr Lys Trp

275

280

285

gtg gcc tac gtg ggt gcg acc tac ctc agc ggc tcg gag gcc agc acc 912

Val Ala Tyr Val Gly Ala Thr Tyr Leu Ser Gly Ser Glu Ala Ser Thr

290

295

300

gtg cgg gcc cag gtg gtc cag atc gtc aag cac ccc ctg tac aac gcg 960
Val Arg Ala Gln Val Val Gln Ile Val Lys His Pro Leu Tyr Asn Ala
305 310 315 320

gac acg gcc gac ttt gac gtg gct gtg ctg gag ctg acc agc cct ctg 1008
Asp Thr Ala Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Thr Ser Pro Leu
325 330 335

cct ttc ggc cgg cac atc cag ccc gtg tgc ctc ccg gct gcc aca cac 1056
Pro Phe Gly Arg His Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr His
340 345 350

atc ttc cca ccc agc aag aag tgc ctg atc tca ggc tgg ggc tac ctc 1104
Ile Phe Pro Pro Ser Lys Lys Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Tyr Leu
355 360 365

aag gag gac ttc ctg gtc aag cca gag gtg ctg cag aaa gcc act gtg 1152
Lys Glu Asp Phe Leu Val Lys Pro Glu Val Leu Gln Lys Ala Thr Val
370 375 380

gag ctg ctg gac cag gca ctg tgt gcc agc ttg tac ggc cat tca ctc 1200
Glu Leu Leu Asp Gln Ala Leu Cys Ala Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu
385 390 395 400

act gac agg atg gtg tgc gct ggc tac ctg gac ggg aag gtg gac tcc 1248
Thr Asp Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser
405 410 415

tgc cag ggt gac tca gga gga ccc ctg gtc tgc gag gag ccc tct ggc 1296
Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly

420

425

430

cgg ttc ttt ctg gct ggc atc gtg agc tgg gga atc ggg tgt gcg gaa 1344
Arg Phe Phe Leu Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu

435

440

445

gcc cgg cgt cca ggg gtc tat gcc cga gtc acc agg cta cgt gac tgg 1392
Ala Arg Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp

450

455

460

atc ctg gag gcc acc acc aaa gcc agc atg cct ctg gcc ccc acc atg 1440
Ile Leu Glu Ala Thr Thr Lys Ala Ser Met Pro Leu Ala Pro Thr Met
465 470 475 480

gct cct gcc cct gcc gcc ccc agc aca gcc tgg ccc acc agt cct gag 1488
Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Thr Ala Trp Pro Thr Ser Pro Glu

485

490

495

agc cct gtg gtc agc acc ccc acc aaa tcg atg cag gcc ctc agt acc 1536
Ser Pro Val Val Ser Thr Pro Thr Lys Ser Met Gln Ala Leu Ser Thr

500

505

510

gtg cct ctt gac tgg gtc acc gtt cct aag cta caa ggt att ttc ggg 1584
Val Pro Leu Asp Trp Val Thr Val Pro Lys Leu Gln Gly Ile Phe Gly

515

520

525

gca gaa agg tag

1596

Ala Glu Arg

530

<210> 2

<211> 531

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Pro Thr Val Ala Asp Val His Leu Val Pro Arg Thr Thr Lys

1

5

10

15

Glu Val Pro Ala Leu Asp Ala Ala Cys Cys Arg Ala Ala Ser Ile Gly

20

25

30

Val Val Ala Thr Ser Leu Val Val Leu Thr Leu Gly Val Leu Leu Ala

35

40

45

Phe Leu Ser Thr Gln Gly Phe His Val Asp His Thr Ala Glu Leu Arg

50

55

60

Gly Ile Arg Trp Thr Ser Ser Leu Arg Arg Glu Thr Ser Asp Tyr His

65

70

75

80

Arg Thr Leu Thr Pro Thr Leu Glu Ala Leu Phe Val Ser Ser Phe Gln

85

90

95

Lys Thr Glu Leu Glu Ala Ser Cys Val Gly Cys Ser Val Leu Asn Tyr

100

105

110

Arg Asp Gly Asn Ser Ser Val Leu Val His Phe Gln Leu His Phe Leu

115

120

125

Leu Arg Pro Leu Gln Thr Leu Ser Leu Gly Leu Glu Glu Glu Leu Leu

130

135

140

Gln Arg Gly Ile Arg Ala Arg Leu Arg Glu His Gly Ile Ser Leu Ala

145

150

155

160

Ala Tyr Gly Thr Ile Val Ser Ala Glu Leu Thr Gly Arg His Lys Gly

165

170

175

Pro Leu Ala Glu Arg Asp Phe Lys Ser Gly Arg Cys Pro Gly Asn Ser

180

185

190

Phe Ser Cys Gly Asn Ser Gln Cys Val Thr Lys Val Asn Pro Glu Cys

195

200

205

Asp Asp Gln Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Ala His Cys Glu

210

215

220

Cys Gly Leu Gln Pro Ala Trp Arg Met Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly

225

230

235

240

Met Glu Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Glu

245

250

255

Asn Lys Glu His Phe Cys Gly Ala Ala Ile Ile Asn Ala Arg Trp Leu
260 265 270

Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asn Glu Phe Gln Asp Pro Thr Lys Trp
275 280 285

Val Ala Tyr Val Gly Ala Thr Tyr Leu Ser Gly Ser Glu Ala Ser Thr
290 295 300

Val Arg Ala Gln Val Val Gln Ile Val Lys His Pro Leu Tyr Asn Ala
305 310 315 320

Asp Thr Ala Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Thr Ser Pro Leu
325 330 335

Pro Phe Gly Arg His Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr His
340 345 350

Ile Phe Pro Pro Ser Lys Lys Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Tyr Leu
355 360 365

Lys Glu Asp Phe Leu Val Lys Pro Glu Val Leu Gln Lys Ala Thr Val
370 375 380

Glu Leu Leu Asp Gln Ala Leu Cys Ala Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu
385 390 395 400

Thr Asp Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser
405 410 415

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly
420 425 430

Arg Phe Phe Leu Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu
435 440 445

Ala Arg Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp
450 455 460

Ile Leu Glu Ala Thr Thr Lys Ala Ser Met Pro Leu Ala Pro Thr Met
465 470 475 480

Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Thr Ala Trp Pro Thr Ser Pro Glu
485 490 495

Ser Pro Val Val Ser Thr Pro Thr Lys Ser Met Gln Ala Leu Ser Thr
500 505 510

Val Pro Leu Asp Trp Val Thr Val Pro Lys Leu Gln Gly Ile Phe Gly
515 520 525

Ala Glu Arg
530

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

ccatcctaatacgcactcact atagggc

27

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

actcactata gggctcgagc ggc

23

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

aggatccagt cacgtagcct ggtgactcg

29

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gtagccccag cctgagatca ggcacttctt g

31

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cgttgatgat ggcgccccca cagaagtgc

29

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ctcgaaggct ggcttgccac ggaaactcc

29

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ctcagccgac acaattgtgc cataggcagc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

cttgcccgga tccctcgctg caatagctcc

30

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

cgccgcaaac tgctgggtcca ccgattcc

29

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

cttgcccgga tccctcgctg caatagctcc

30

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

aaaggactcc cagggtgagg acgacaaggc tg

32

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tggccaccac gccaatggtg gccgctcgac

30

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

cgtgagctgg ggaatcgggt gtgcggaagc c

31

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gcgtccaggg gtctatgcc gagtcaccag

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

atgccgcgtg ctgtcgagcg gccaccattg

30

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atggagccca ctgtggctga cgtacacctc gtgc

34

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ctttagctt aggaacggtg acccagtc

28

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

aatctagagc catggagccc actgtggctg acgtacac

38

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gtgcgggccc aggtggtcca gatcgtcaag

30

<210> 22

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 22

aagcggccgc cttttctgcc ccgaaaatac ctgttag

37

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

aagatctcta cacagggctt ccacgtggac cacac

35

<210> 24

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

aactcgagct acctttctgc cccgaaaata cc

32

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 25

aagatcttgg tgggcggcat ggaagcat

28

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 26

aactcgagct accagtcacg tagcc

25

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 小腸で産生されるホルモンのプロセッシングに関わるセリンプロテアーゼを提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明者らは、小腸で産生されるホルモンのプロセッシングに関わるヒトの新規な I I 型膜貫通セリンプロテアーゼ遺伝子全長配列、全長 O R F を決定することに成功した。更に、全長遺伝子を取得、組換え体の発現を可能にした。該プロテアーゼの活性を検出する方法を確立し、これにより該プロテアーゼの活性を阻害する過敏性腸症候群治療薬として有用な物質のスクリーニングを可能にした。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-223878
受付番号	50201135549
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 8月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 7月31日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-223878

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社